



TITLE:

UCHL1-HIF-1 axis-mediated antioxidant property of cancer cells as a therapeutic target for radiosensitization( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Nakashima, Ryota

---

CITATION:

Nakashima, Ryota. UCHL1-HIF-1 axis-mediated antioxidant property of cancer cells as a therapeutic target for radiosensitization. 京都大学, 2018, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20974>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	中 島 良 太
論文題目	UCHL1-HIF-1 axis-mediated antioxidant property of cancer cells as a therapeutic target for radiosensitization (UCHL1-HIF-1 経路による抗酸化作用はがん細胞に対する放射線増感のための治療標的である)		
(論文内容の要旨)			
<p>放射線治療における照射技術の進歩は、腫瘍への線量増加および正常組織への線量低下を可能とし、放射線治療はがん治療の中でより重要な役割を果たすようになった。しかし、放射線治療後に腫瘍が再発するケースが未だに散見され、その原因として放射線治療抵抗性がん細胞の存在と、低酸素誘導性転写因子 1 (hypoxia-inducible factor 1: HIF-1) の関与が指摘されている。HIF-1 は生体の低酸素応答を担うマスター制御因子で、特に酸化的リン酸化の抑制と解糖系の亢進というグルコース代謝経路リプログラミングの引き金として機能することが明らかにされている。グルコース代謝経路のリプログラミングは、細胞の抗酸化能と放射線抵抗性を誘導する一因であることが知られているが、HIF-1 によるグルコース代謝経路のリプログラミングを引き起こす遺伝子ネットワーク、およびリプログラミングと放射線治療抵抗性を結ぶメカニズムには不明な点が多い。本研究では、新規 HIF-1 活性化因子として近年同定された脱ユビキチン化酵素 ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCHL1)が、HIF-1 の活性化を介してがん細胞の放射線抵抗性を誘導するかを検証し、その分子機構を解明することを試みた。</p> <p>いくつかのがん細胞株を対象に内在性 UCHL1 の発現量を Western blotting 法で検証したところ、マウス乳がん細胞株 EMT6 の UCHL1 発現レベルが極めて低いことが分かった。HIF-1 活性をルシフェラーゼ発光としてモニターできるレポーター遺伝子を用いることで、EMT6 に UCHL1 過剰発現ベクターを導入した場合に、HIF-1 活性が有意に亢進することを確認した。この時、HIF-1 の主要制御サブユニット HIF-1α の安定性が上昇していることが、当該タンパク質の安定性をモニターできるレポーター遺伝子を用いて確認された。実際に HIF-1α を対象に Western blotting を実施したところ、UCHL1 の過剰発現によって HIF-1α タンパク質の発現量が有意に増加することが確認された。共免疫沈降実験で、ユビキチン化された HIF-1α タンパク質を定量したところ、UCHL1 を過剰発現させた場合にユビキチン化 HIF-1α レベルが減少することを見出した。加えて、脱ユビキチン化活性を欠失させた UCHL1 の点変異体 UCHL1 C90S が HIF-1α の安定性に何ら変化を与えなかったことから、UCHL1 が HIF-1α タンパク質を脱ユビキチン化することで、HIF-1α タンパク質を安定化していると結論付けた。</p> <p>次に、<sup>13</sup>C 標識したグルコースで EMT6 を処理した後、標識された代謝産物を質量分析法で定量することで、UCHL1 による HIF-1 の活性化がグルコース代謝経路のリプログラミングを引き起こすか否かを検証した。その結果、UCHL1 の過剰発現によって、乳酸の有意な増加と TCA 回路中間代謝産物のクエン酸、およびイソクエン酸の有意な減少が認められた。また、HIF-1α をノックダウンした際にその変化が消失したことから、UCHL1 が HIF-1 依存的にグルコース代謝経路のリプログラミングを引き起こすことが明らかになった。この UCHL1-HIF-1 依存的なリプログラミングに付随して、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (glucose-6-phosphate dehydrogenase X: G6PDX) 依存的にペントースリン酸経路を介して NADPH が産生されること、そしてこれが還元型グルタチオン (GSH) の産生に使われることを示すデータを得た。</p> <p>最後に、UCHL1 が放射線治療抵抗性を引き起こすか否かを検証する目的で、EMT6 に UCHL1 発現ベクターを安定導入した細胞株を樹立し、コロニー形成試験を実施した。その結果、UCHL1 による放射線治療抵抗性の誘導が確認された。抗酸化物質 N-acetyl cysteine を添加した場合に、UCHL1 非発現細胞株では放射線治療抵抗性が誘導されたが、UCHL1 発現ベクター</p>			

<p>導入細胞株では誘導されなかったことから、UCHL1 による放射線抵抗性が細胞の抗酸化能の亢進に依存していることが示唆された。また、HIF-1α をノックダウンした場合に UCHL1 による放射線治療抵抗性がほぼ完全に消失し、同様に G6PDX 特異的阻害剤 6-アミノニコチンアミドで細胞を処理した場合にも UCHL1 による放射線治療抵抗性が大幅に減弱したことから、UCHL1 が HIF-1 の活性化を介してペントースリン酸経路依存的に細胞の放射線抵抗性を誘導する作用を持つことが示唆された。</p> <p>以上の結果から、UCHL1 が HIF-1 の活性化を介してグルコース代謝経路を解糖系優位な状態にリプログラミングし、そしてペントースリン酸経路依存的に NADPH と GSH を産生することで放射線治療抵抗性を亢進させることが明らかになった。また、UCHL1-HIF-1 経路が放射線治療抵抗性の抑制につながる標的として利用し得ることが示された。</p>			
<p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>本研究で中島良太氏は、低酸素誘導性転写因子（hypoxia-inducible factor 1 : HIF-1) 依存的に解糖系を亢進する遺伝子として、Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL1) を同定した。また、UCHL1-HIF-1 経路によるグルコース代謝経路のリプログラミングがペントースリン酸経路を介してがん細胞の抗酸化能を誘導し、がんの放射線抵抗性を亢進する可能性を示した。</p> <p>具体的には、UCHL1 が HIF-1 の主要制御サブユニット（HIF-1α）を脱ユビキチン化することで安定化し、HIF-1 活性を上昇させることを確認した。次に、<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-グルコースの代謝フラックスを解析するメタボローム解析によって、UCHL1 が活性化した場合にグルコース代謝経路が解糖系優位な状態にリプログラミングされることを明らかにした。そしてこの時、ペントースリン酸経路を介して産生される NADPH の還元作用によって、抗酸化物質である還元型グルタチオン量が増加することを明らかにした。最後に、コロニー形成試験によって、UCHL1 が HIF-1 およびペントースリン酸経路依存的にがん細胞の放射線抵抗性を誘導することを示した。以上の結果から、「HIF-1 の活性化を介したグルコース代謝経路のリプログラミング」と「ペントースリン酸経路依存的な抗酸化能の亢進」によって、UCHL1 ががん細胞の放射線抵抗性を亢進することを明らかにした。</p>			
<p>以上の研究は、UCHL1-HIF-1 経路ががんの放射線治療抵抗性を引き起こすメカニズムを解明し、もって放射線治療効果の増強に繋がり得る新たな治療標的を提示したものであり、今後のがん放射線治療の成績向上に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 12 月 19 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
<p>要旨公開可能日：                      年                      月                      日 以降</p>			